DOI:10.11931/guihaia.gxzw202308066

多胺对荔枝胚性愈伤组织增殖与体胚分化的影响

王 果[1]，刘耀婷[1, 2]，李焕苓[1]，王树军[1]，李芳[1]，王家保[1*]

(1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所·农业农村部儋州农业环境科学观测实验站，海南 儋州 571737；2. 海南大学热带作物学院，海口 570228）

摘 要：为探讨外源多胺（PAs）对荔枝胚性愈伤组织（EC）增殖及体胚分化的影响机制，该研究以“妃子笑”荔枝 EC 为材料，采用单因素法在增殖培养基中添加腐胺（Put）、亚精胺（Spd）及精胺（Spm），分析了不同 PAs 处理后 EC 形态、结构、内源 PAs 含量及相关酶指标的变化。结果表明：（1）外源 Put、Spd 和 Spm 处理均显著提高了 EC 增殖率，降低了体胚诱导及萌发数量。经外源 PAs 处理增殖的 EC 胚性细胞大小较一致，染色深且均匀，多细胞原胚减少，可见已经分化完全的早期子叶胚。（2）外源 PAs 处理均显著提高了 EC 中内源 PAs 含量，其中 Put 处理 EC 中各类内源 PAs 及总 PAs 含量最高；当在含外源 PAs 培养基上增殖的 EC 转入不含外源 PAs 的培养基上增殖时（恢复培养），EC 中的 Put 含量仍然显著高于对照，内源 Spd 和 Spm 则显著降低。（3）外源 Put 处理显著提高了 EC 中的鸟氨酸脱羧酶（ODC）、精氨酸脱羧酶（ADC）和二胺氧化酶（DAO）活性，而外源 Spd、Spm 处理显著降低了 EC 中的 ODC 及 ADC 活性，外源 Spd 显著提高了多胺氧化酶（PAO）活性；恢复培养后，EC 中 ADC 和 DAO 活性比恢复培养前显著降低，ODC、PAO 无显著性差异。综上认为，外源 PAs 可以通过调节 PAs 代谢相关酶活性影响内源 PAs 含量，进而影响荔枝 EC 增殖和体胚诱导。该研究结果为进一步研究 PAs 调节荔枝体胚发生机制，提高荔枝离体再生效率提供了基础。

关键词：荔枝，离体再生，组织切片，多胺，酶活性

中图分类号：Q94　　　　**文献标识码**：A

Influences of polyamines on callus proliferation and somatic embryogenesis in *Litchi chinensis*

WANG Guo [1], LIU Yaoting [1,2], LI Huanling [1], Wang Shujun [1], Li Fang [1], WANG Jiabao [1*]

（1. *Environments and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences/Danzhou Scientific Observing and Experimental Station of Agro-Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,* Danzhou 571737, China, Hainan；2. *College of Tropical Crops, Hainan University*, HaiKou 570228, China）

Abstract: To explore the effect of exogenous polyamines (PAs) on embryogenic callus (EC) proliferation and somatic embryogenesis of litchi, the morphology, structure, endogenous PA content and related enzyme activities were systematically investigated using the ‘Feizixiao’ ECs as materials subcultured on the medium supplemented with various PAs. The results were as follows: (1) The exogenous putrescine (Put), spermidine (Spd), and spermine (Spm) treatment significantly increased the EC proliferation rate and reduced the amount of induced somatic embryos and regenerated plantlets. The proliferated embryogenic cells after exogenous PA treatments were more consistent in size and stained deeply and evenly. Furthermore, multicellular proembryos in EC were reduced, and fully differentiated early cotyledon embryos could be seen. (2) All the exogenous PA treatments significantly increased the endogenous PA content in EC. Among them, Put treatment had the highest content of each endogenous PA component and total PA. When the EC proliferated on the medium containing exogenous PAs was transferred to the medium without exogenous PAs (M3) for proliferating, the Put content in the EC was still significantly higher than

---

基金项目：海南省自然科学基金（320QN312）；国家现代农业产业技术体系（CARS-32）；海南省自然科学基金面上基金（323MS100）。

第一作者：王果（1987–），硕士，助理研究员，主要从事荔枝生物技术育种，（E-mail）wanglucai@sina.com。

*__通信作者__：王家保，博士，研究员，主要从事荔枝育种，（E-mail）fdabo@163.com。

the control, however, the endogenous Spd and Spm were significantly decreased. (3) Exogenous Put treatment significantly increased the activities of ornithine decarboxylase (ODC), arginine decarboxylase (ADC), and diamine oxidase (DAO) in EC, while exogenous Spd and Spm treatments significantly reduced the activities of ADC and DAO in EC, and exogenous Spd significantly increased PAO activity. When transferred to the M3 medium, the ADC and DAO activities of newly proliferated EC were significantly lower than those of EC cultured with exogenous PAs, but there was no significant difference in ODC and PAO activities. In summary, the exogenous PAs can affect endogenous PA content by regulating the activity of enzymes related to polyamine metabolism, thereby affecting EC proliferation and somatic embryo induction in litchi. These results would provide a basis for further study on the mechanism of PAs regulating litchi regeneration *in vitro.*
Key words: litchi (*Litchi chinensis*), plant regeneration, histological section, polyamines, metabolic enzymes

荔枝（*Litchi chinensis*）是华南重要的南亚热带果树，是助推乡村振兴重要产业之一（陈厚彬等，2023）。荔枝产期集中，病虫危害严重等限制着产业的高质量发展，选育不同熟期、优质、多抗等优良品种是解决这些问题的根本途径。传统育种方式如杂交育种、实生选种等，具有耗费大、周期长、效率低等不足，基因编辑等生物技术可克服这些不足，是荔枝育种的重要发展方向（Das & Rahman，2010）。高效的离体再生技术体系是生物育种的前提，但在荔枝上，经体胚发生途径获得再生植株的报道鲜少，主要是体胚诱导率低，畸形胚多导致萌发率低（Das et al.，2016；Wang et al.，2016；秦雅琪，2019），阻碍了生物育种的应用。研究提高荔枝离体再生效率的技术并探索其作用机制，对促进荔枝生物育种发展具有重要的现实意义。

已有较多关于影响荔枝胚性愈伤组织（embryogenesis callus，EC）增殖和体胚发生的因素的研究，如基本培养基和碳源（Raharjo & Litz，2007；Das et al.，2016），2,4-D、玉米素及激动素等生长调节因子（Puchooa，2004；Ma et al.，2008；秦雅琪，2019）、有机附加物（Yu et al.，2000；Wang et al.，2023；王果等，2023）等，但鲜见多胺调控荔枝离体再生的报告。多胺（polyamine，PA）是一类广泛存在于原核生物及真核生物中、具有强烈生物活性的低分子量脂肪族含氮碱，在植物生长发育及离体再生中起着重要作用（Rakesh et al., 2021）。Sathish 等（2019）研究发现外源 PAs 促进了甘蔗（*Saccharum* spp. hybrid）体胚发生及再生效率，分别提高了 2 倍和 3 倍以上。El-dawayati 等（2018）发现枣椰（date palm）EC 在含亚精胺（spermidine，Spd）固体培养基上发育最好，体胚发生数量在含腐胺（putrescine，Put）的液体培养最多。本课题前期研究发现，“妃子笑”荔枝（*Litchi chinensis* cv. Feizixiao）愈伤组织多胺氧化酶（polyamine oxidase，PAO）活性与体胚发生呈正相关（吉训志，2019）；进一步研究表明，PAs 和相关代谢酶的内源性变化与荔枝 EC 增殖及体胚诱导的不同发育阶段（从愈伤组织到 EC、早期体胚诱导）的结构相一致；Put 及精胺（spermine，Spm）是荔枝 EC 中的主要 PAs，体胚诱导过程中的 Put 及 Spd 含量整体上高于 EC 增殖阶段；Spm 含量相反，EC 增殖过程中的 Spm 平均含量高于体胚诱导阶段。PAO 及二胺氧化酶（diamine oxidase，DAO）活性与 Put 含量呈正相关（王果等，2021a）。更进一步研究发现，在 EC 增殖阶段添加 3 类 PAs 会抑制荔枝体胚发生，而多胺抑制剂（D-精氨酸或环己胺）则显著促进 EC 增殖及体胚发生；在体胚发生阶段中添加 Put、Spm 或环己胺抑制荔枝体胚发生及萌发，而 D-精氨酸或 Spd 则促进体胚发生及萌发（王果等，2021b）。这些结果表明 PAs 在荔枝 EC 增殖及体胚分化中发挥着重要作用，但其机制尚不清晰。本研究以“妃子笑”荔枝 EC 为材料，采用单因素法，通过在增殖培养基中添加不同 PAs，拟探讨以下问题：（1）进一步证实不同 PAs 是否会影响荔枝 EC 的增殖及体胚发生能力；（2）外源 PAs 影响 EC 增殖及体胚发生的作用机制。

1　材料与方法

1.1　材料

“妃子笑”荔枝 EC 于 2015 年 3 月采用花药诱导获得，在 M3（MS 为基本培养基，附加 2,4-D 1 $mg \cdot L^{-1}$）和 M4 培养基上（MS 为基本培养基，附加 2,4-D 1 $mg \cdot L^{-1}$、KT 0.5 $mg \cdot L^{-1}$ 和 $AgNO_3$ 5 $mg \cdot L^{-1}$）以 30 d 为 1 个周期交替继代保存（李焕苓，2009）。

1.2 方法

1.2.1 含 PAs 培养基对 EC 增殖、体胚发生及萌发的影响

在M4培养基上继代30 d的EC，分别转接于M3（CK）、P3（M3培养基附加Put 15 mg·L^{-1}）、S2（M3培养基附加Spd 10 mg·L^{-1}）和S7（M3培养基附加Spm 15 mg·L^{-1}）培养基（王果等，2021b），称重初始接种量（G_0）。培养3周后称重EC重量（G_1），EC增殖率=（G_1-G_0）/（G_0）。

将在上述4种培养基上增殖的EC，分别接种于体胚诱导培养基T3（MS为基本培养基，附加NAA 0.1 mg·L^{-1}及KT 5 mg·L^{-1})上，培养7周后记录体胚发生情况，计算每克EC诱导获得的体胚总量和双子叶体胚数量。

上述获得的所有乳白色体胚接种在C19培养基（MS为基础培养基，附加ABA 1 mg·L^{-1}和IAA 0.5 mg·L^{-1}）进行成熟，8周后转接于R7萌发培养基（1/2 MS为基础培养基，附加 GA_3 1 mg·L^{-1}）上，12h/12h光暗交替培养，8周后统计每克EC体胚的萌发数量及形态等。

1.2.2 恢复培养对 EC 增殖、体胚发生及萌发的影响

将在 M3、P3、S2 和 S7 上培养 3 周的 EC，分别转接到不含 PAs 的 M3 培养基上[处理编号分别为 M3M3（CK）、P3M3、S2M3 和 S7M3]。培养 3 周后，这些处理的 EC 再分别转接于 T3 培养基上诱导体胚。各项指标统计同 1.2.1。

以上各处理培养基 pH 值均调至 5.8。EC 增殖及萌发培养基均添加蔗糖 30 g·L^{-1} 和琼脂 7 g·L^{-1}，体胚诱导和成熟培养基均添加蔗糖 60 g·L^{-1} 和琼脂 10 g·L^{-1}。如无特殊说明，均为 (25±2) ℃下黑暗培养。

1.2.3 EC 形态与结构观察

上述各处理培养3周后的EC，取少量轻放在载玻片上，滴上清水，采用牙签轻搅混匀，盖上盖玻片后，在超景深显微镜（KEYENG VHX-5000，大阪，日本）下观察EC细胞形态。

石蜡切片的制作主要参照吉训志（2019）的方法，EC 采用 Ehrlich 苏木素染色，制片后在超景深三维显微系统下观察记录。

1.2.4 EC 中 PAs 含量及 PAs 代谢酶活性测定

取在 M3、P3、S2、S7 及 M3M3、P3M3、S2M3 和 S7M3 共 8 种培养基上培养 3 周的 EC，液氮速冻后置于-80 ℃保存。

称取 0.1 g 上述各处理 EC，参考吉训志（2019）的方法，提取 PAs 并采用液相串联质谱仪（Thermo scientific, Exactive plus，马萨诸塞州，美国）测定 PAs 含量。

称取 2 g 上述各处理 EC，参照吉训志（2019）、赵福庚和刘友良（2000）的方法，提取粗蛋白，测定 PAO、DAO、精氨酸脱羧酶（arginine decarboxylase，ADC）和鸟氨酸脱羧酶（ornithine decarboxylase，ODC）活性。

1.2.5 数据统计分析

1.2.1 和 1.2.2 均重复 2 批次。每批次每处理各 15 皿，以每 5 皿为 1 个重复，重复 3 次。结果用 2 批次 6 次重复的平均值表示。1.2.4 用第二批次 EC 进行测定，重复 3 次。采用 DPS 软件对数据进行单因素方差分析（One-way ANOVA）和 Duncan’s 多重比较（唐启义，2010）。

2 结果与分析

2.1 不同 PAs 对 EC 增殖率及细胞形态与结构的影响

2.1.1 培养基添加 PAs 对 EC 增殖的影响

含 PAs 培养基 EC 增殖率都显著高于对照（M3）（表 1）。其中，S2 处理上的 EC 增殖率最高，是初始接种量的 14.14 倍；其次分别为 S7 及 P3，EC 增殖率分别是初始接种量的 12.47 和 10.79 倍；M3 处理上的 EC 增殖率最低，是初始接种量的 9.71 倍。

表 1 含不同 PAs 培养基对 EC 增殖、体胚发生及萌发的影响

Table 1 Effects of different polyamines on EC proliferation, somatic embryogenesis and plant regeneration

处理 Treatment	腐胺 Put	亚精胺 Spd	精胺 Spm	增殖率 Proliferation (fold)	体胚数量 No. of embryo（ind.·g^{-1} FW）	双子叶胚数量 No. of dicotyledonous embryo（ind.·g^{-1} FW）	萌发数量 No. of germination（plant·g^{-1} FW）
M3	0	0	0	9.71±0.07d	226±11.93a	26±4.66b	14±1.73a
P3	15	0	0	10.79±0.25c	78±6.93b	40±0.85a	3±0.51b

S2	0	10	0	14.14±0.59a	32±4.00d	7±1.31c	1±0.62b
S7	0	0	15	12.47±0.17b	56±7.21c	8±1.73c	1±1.10b

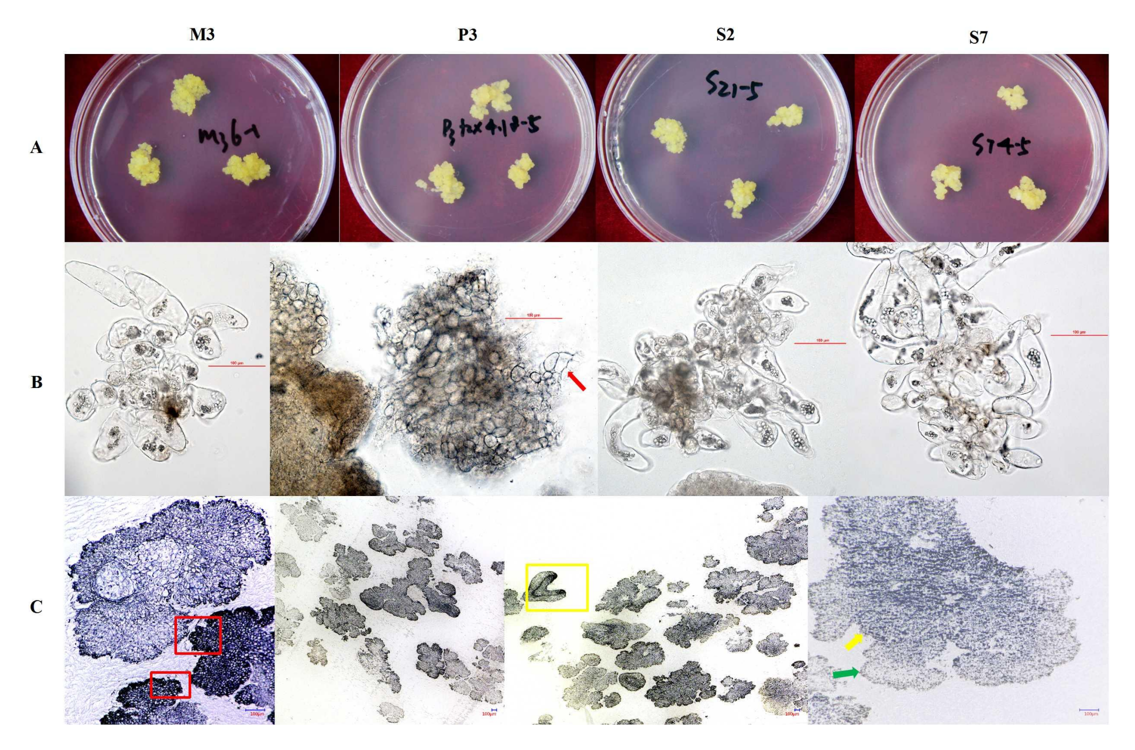
注：表中同一列数据后的不同字母表示 Duncan’s 新复极差法测验差异显著（P<0.05）。下同。

Note: Different letters in the same column indicate significant differences in Duncan’s new complex range test (P <0.05). The same as below.

含 PAs 培养基 EC 颗粒较细小，仅在 EC 顶部或者边缘部位分化个别原胚及非胚性愈伤组织（non-embryonic callus，NEC）；而 M3 处理上的 EC 颗粒稍粗且混杂较多原胚及 NEC，较难挑出 EC（图 1：A，M3）。

M3 处理 EC 细胞多为椭圆或圆形，处于同时分裂分化状态。S2 及 S7 处理 EC 细胞多为长圆形，分裂旺盛；而 P3 处理 EC 细胞几乎都为圆形且细胞外缘较厚（图 1：B，红色箭头）。

切片观察发现含 PAs 培养基 EC 细胞大多数分裂旺盛，含有早期子叶胚等；而 M3 处理 EC 细胞分裂分化同时进行，分化较多多细胞原胚或者早期球形胚（图 1：C，红框）。P3 处理 EC 染色较浓且均匀，NEC 染色较浅，极易区分。S2 处理 EC 有早期子叶胚等分化（图 1：C，黄框），S7 处理内部 EC 胚性细胞染色较深（图 1：C，黄箭头），分裂旺盛；外缘非胚性细胞染色较浅（图 1：C，绿箭头）。



红框. 原胚；**黄框**. 子叶胚；**红箭头**. 细胞边缘较厚；**黄箭头**. 胚性细胞；**绿箭头**. 非胚性细胞；**A**. 培养皿直径 9 cm；**B**，**C**. 标尺=100 μm。

Red border. Proembryo; **Yellow border**. Cotyledon embryo; **Red arrow**. The thicker cell margin; **Yellow arrow**. Embryonic cell; **Green arrow**. Non-embryonic cell; **A**. 9 cm diameter petri dish; **B**, **C**. Scale bars=100 μm.

图 1　含不同 PAs 培养基上的 EC 形态

Fig. 1　The morphology of EC on medium supplemented with different PAs

2.1.2　恢复培养对 EC 增殖的影响

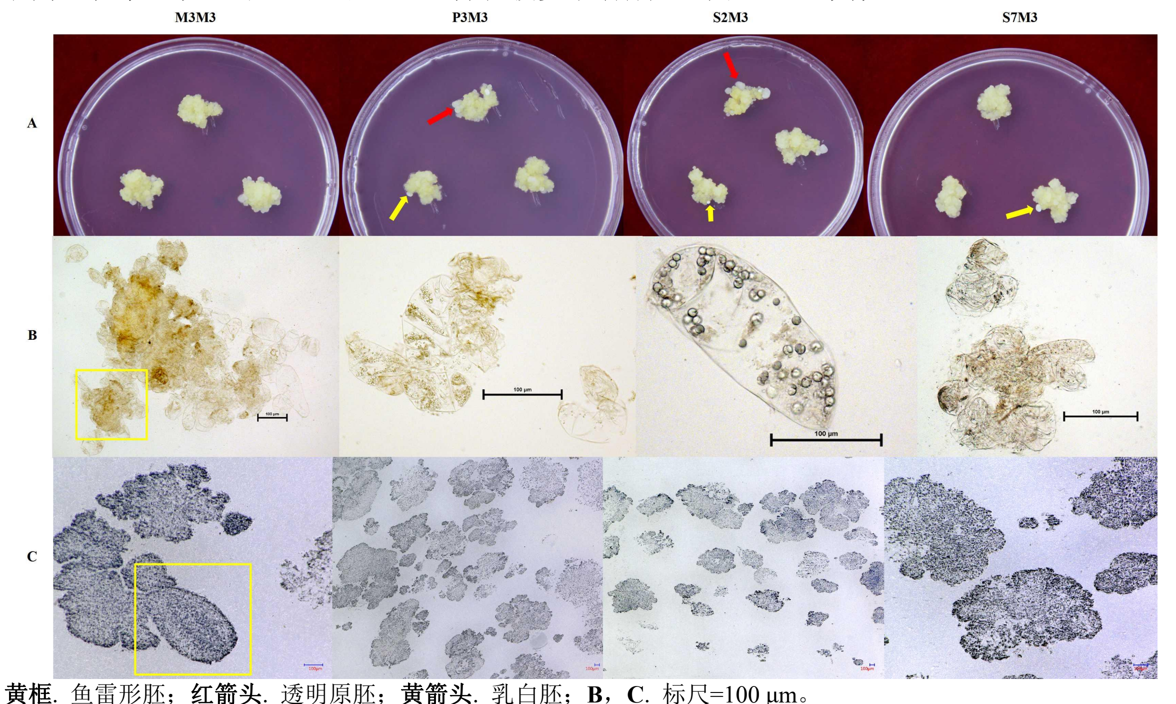
将上述 4 种培养基上培养 3 周获得的 EC 分别重新转接到不含 PAs 的 M3 培养基，培养 3 周后发现，S2M3 处理上的 EC 增殖率最高，是初始接种量的 10.75 倍；S7M3 和 P3M3 处理上的 EC 增殖率分别为初始接种量的 9.70、9.67 倍；M3M3 的 EC 增殖率仍最低，为初始接种量的 8.72 倍。增殖率由高到低为 S2M3、S7M3、P3M3，增殖趋势与 S2、S7、P3 的相同且恢复培养（P3M3、S2M3 及 S7M3）EC 增殖率仍显著高于对照 M3M3（表 2），低于含 PAs 培养基（P3、S2 及 S7），说明添加的外源 PAs 对 EC 增殖的促进作用，在培养基中去掉 PAs 后被部分削弱。

表 2　恢复培养对 EC 增殖、体胚发生及萌发的影响

Table 2　Effects of recovery culture on EC proliferation, somatic embryogenesis and plant regeneration

处理 Treatment	增殖率 Proliferation (fold)	体胚数量 No. of embryo （ind.·g^{-1} FW）	双子叶胚数量 No. of dicotyledonous embryo （ind.·g^{-1} FW）	萌发数量 No. of regeneration （plant·g^{-1} FW）
M3M3	8.72±0.31c	250±14.00a	42± 4.58a	23±2.54a
P3M3	9.67±0.58b	170±15.62b	28±3.06b	16±3.84b
S2M3	10.75±0.22a	124±15.62c	15±2.08c	5±2.23c
S7M3	9.70±0.35b	108±12.49c	10±1.62d	9± 2.29c

与含 PAs 培养基相比较，恢复培养 EC 分化乳白（图 2：A，黄箭头）或者透明原胚（图 2：B，红箭头）的数量增多，P3M3 及 S2M3 处理上的 EC 分化的原胚较多（图 2：A，红箭头）。M3M3、P3M3 及 S7M3 培养基 EC 细胞多为圆形或椭圆形，分裂分化交织成团，细胞聚集，夹杂多细胞原胚（图 2：B，黄框）。S2M3 处理上的 EC 细胞呈椭圆形，细胞质体较多（图 2，B，S2M3）。切片观察发现，PAs 上来源的 EC 恢复培养后，原胚形成层细胞裂解凋亡，无体胚分化，胚性细胞染色均匀，大小一致；与含 PAs 培养基上的 EC 以细胞分裂为主现象一致。而 M3M3 处理 EC 分化较多早期体胚（图 2：C，黄框）。



黄框. 鱼雷形胚；**红箭头**. 透明原胚；**黄箭头**. 乳白胚；**B**，**C**. 标尺=100 μm。

Yellow border. Torpedo embryo; **Red arrow**. Hyaline proembryo; **Yellow arrow**. Opal embryo; **B**，**C**. Scale bars=100 μm。

图 2　恢复培养后的 EC 形态

Fig. 2　The morphology of EC proliferated on medium with exogenous PAs followed by culture on M3 medium (recovery culture)

2.2　不同 PAs 培养基对体胚发生及萌发的影响

2.2.1　培养基添加不同 PAs 对体胚发生及萌发的影响

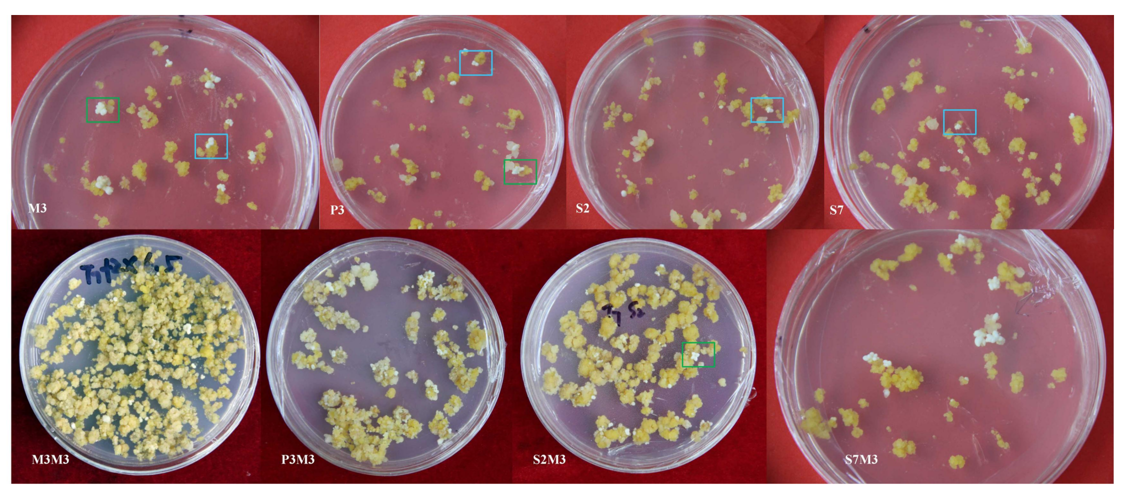
含 PAs 培养基上增殖的 EC 体胚诱导效率显著降低（表 1），尤其是 S2 处理上的体胚诱导效率最低，每克 EC 仅诱导出约 32 个体胚，远远低于对照（226 个体胚）。其次依次为 S7 及 P3 处理，每克 EC 仅分别获得 56、78 个体胚。

PAs 均显著降低了体胚诱导效率，但对双子叶胚诱导效果不同（表 1）。Put 显著提高

了双子叶胚诱导效率，P3 处理上每克 EC 可诱导 40 个双子叶胚；S2 和 S7 处理上的双子叶胚诱导效率显著低于对照，每克 EC 仅分别产生 7、8 个双子叶胚。

M3 处理上的 EC 诱导获得的多数为球形胚（图 3：M3，蓝框）、子叶形胚（图 3：M3，绿框）等较多不同步体胚，P3 处理上的 EC 仅分化少量簇生球形胚（图 3：P3，蓝框）及子叶胚（图 3：P3，绿框），而 S2 及 S7 处理上的 EC 分化的几乎都为簇生的鲜亮乳白球形胚（图 3：S2 及 S7，蓝框）。含 PAs 培养基上的 EC 诱导的的体胚饱满，呈现部分红色（图 4：蓝框）。

含 PAs 培养基上的 EC 诱导的体胚萌发效率显著低于 M3（表 1），尤其是 S2 和 S7 处理上的体胚萌发效率最低，每克 EC 仅有 1 个体胚萌发；P3 处理上每克 EC 诱导获得的体胚萌发仅 3 个，这些植株茎节间短小、粗壮、叶片深绿、较易移栽成活（图 4：B）。

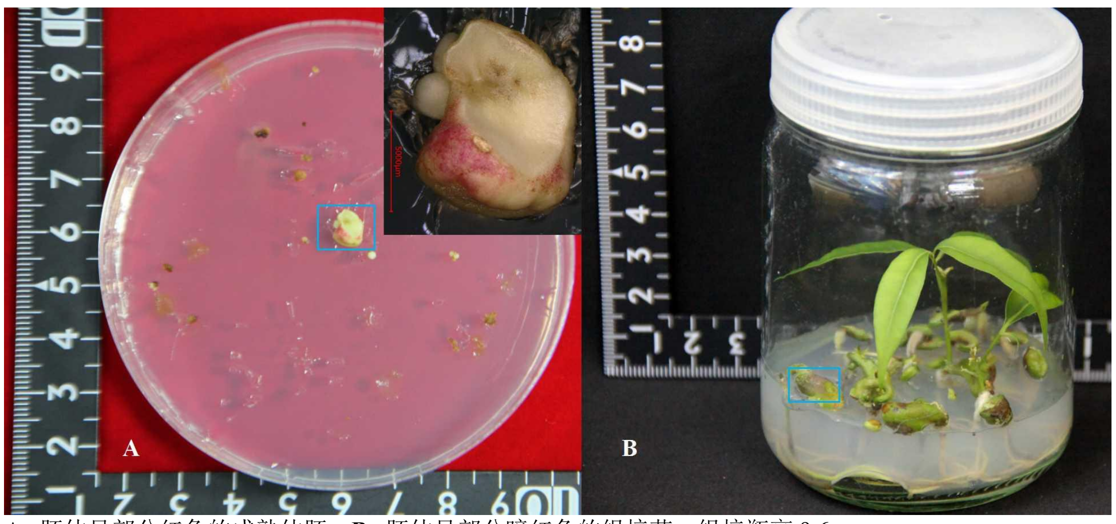


绿框. 簇生子叶胚；**蓝框**. 球形胚。

Green border. Tufted cotyledon embryo；**Blue border**. Globular embryo.

图 3　不同 PAs 培养基体胚发生

Fig. 3　Somatic embryogenesis on medium with different PAs



A. 胚体呈部分红色的成熟体胚；**B**. 胚体呈部分暗红色的组培苗，组培瓶高 9.6 cm。

A. Maturate embryo with partially red color；**B**. Regenerated plantlets with partially dark red embryo in culture bottle at 9.6 cm height.

图 4　体胚成熟及萌发

Fig. 4　The somatic embryos maturation and plant regeneration

2.2.2　恢复培养对体胚发生及萌发的影响

经恢复培养的 EC 体胚和双子叶胚发生数量、体胚萌发数量均显著低于对照（M3M3）（表 2），P3M3 处理上的 EC 体胚和双子叶胚发生数量、体胚萌发数量仍高于 S2M3 和 S7M3。

恢复培养获得的体胚鲜乳白色，状态饱满，然而在光下转绿时间较长，萌发相对较缓慢。

如表 2 所示，恢复培养后的 EC 体胚诱导效率比 P3、S2、S7 培养基处理大幅提升，S2M3、S7M3 处理上的双子胚发生效率大幅高于 S2 及 S7 处理，但 P3M3 处理上的双子叶胚发生效率反而低于 P3 处理。S2M3 处理上的体胚及双子叶胚发生数量恢复最高，分别是 S2 处理的 3.88 和 2.14 倍。S7M3 处理体胚及双子叶胚发生数量分别是 S7 处理的 1.93 和 1.25 倍。P3M3 处理上的体胚发生数量是 P3 处理的 2.18 倍，但 P3M3 处理上的双子叶胚数量（28 个双子叶胚/EC）低于 P3 处理（40 个双子叶胚/EC）。

P3M3、S2M3、S7M3 处理上的 EC 诱导的体胚，萌发数量分别高于 P3、S2 及 S7 处理（表 2）。P3M3 处理获得的体胚萌发数量最高，每克 EC 可获得 16 株组培苗，显著高于 S2M3 和 S7M3 处理。

2.3　不同 PAs 培养基上 EC 内源 PAs 含量及其相关酶活性差异

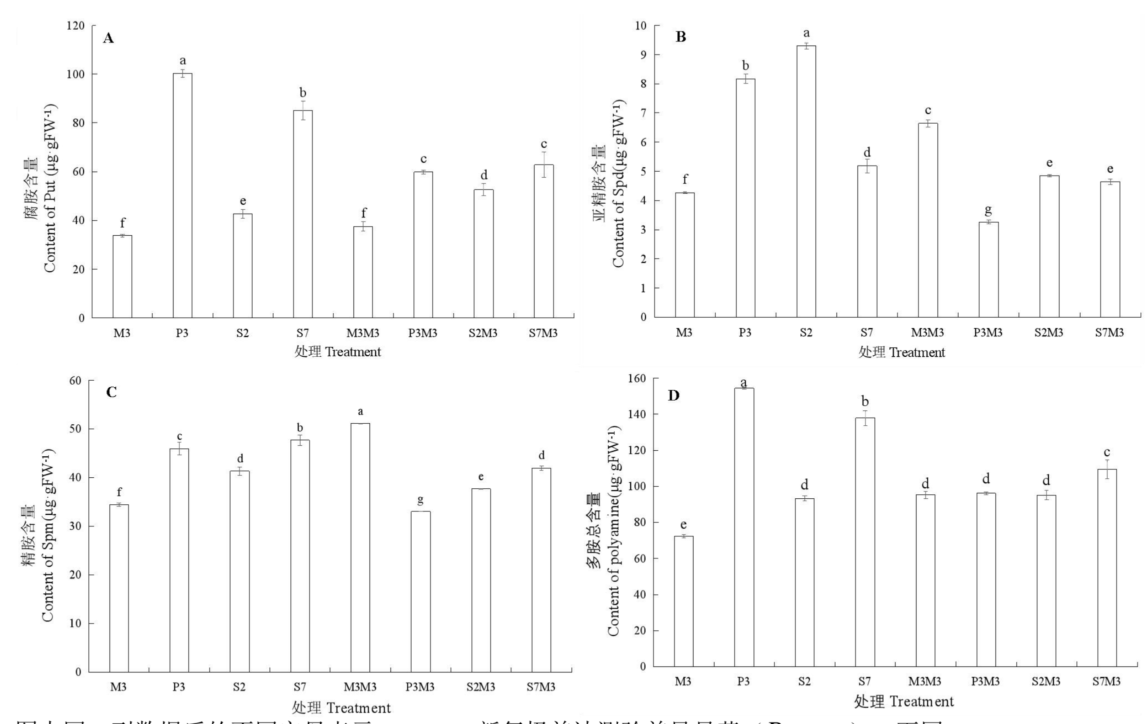
2.3.1　不同 PAs 培养基上 EC 内源 PAs 含量

含 PAs 及恢复培养基上的 EC Put 含量都显著高于对照，P3 处理上 Put 含量最高，其次为 S7 处理，S2 处理最低。恢复培养后，含 PAs 来源的 EC Put 含量仍显著高于 M3M3 处理上的 Put 含量，S2M3 处理的 Put 含量显著高于 S2 处理，但 P3M3、S7M3 处理的 Put 含量分别显著低于 P3、S7 处理（图 5：A）。

含 PAs 培养基 Spd 含量显著高于 M3 及恢复培养处理，S2 处理上的 Spd 含量最高，其次依次为 P3 和 S7 处理。恢复培养后，PAs 来源的 EC Spd 含量都相应降低，与 M3M3 差异显著；P3M3 处理上的 Spd 含量最低，与 S2M3 和 S3M3 处理上的 Spd 含量差异显著，而 S2M3 处理上的 Spd 含量和 S3M3 上的无显著性差异（图 5：B）。

与 Spd 含量变化一致，含 PAs 培养基上 EC 中 Spm 含量显著高于 M3 处理，3 种 PAs 处理上的 Spm 含量差异显著，其中 S7 上 Spm 含量最高，其次分别为 P3 和 S2。恢复培养后，PAs 来源的 EC Spm 含量都相应降低，显著低于 M3M3；S7M3 处理上的 Spm 含量最高，其次分别为 S2M3 和 P3M3，3 种处理上的 Spm 含量差异显著（图 5：C）。

含 PAs 培养基 PAs 总量变化与 Put 一致且显著高于 M3 处理；P3 处理上的 PAs 总量最高，其次分别为 S7 和 S2 处理。恢复培养后，P3M3、S2M3 处理上的总胺含量与对照无差异，仅 S7M3 处理上的 PAs 总量显著高于 M3M3、P3M3 和 S2M3 处理（图 5：D）。



图中同一列数据后的不同字母表示 Duncan’s 新复极差法测验差异显著（P＜0.05）。下同。

Different letters in the same column indicate significant differences in Duncan’s new complex range test (P < 0.05). The same as below.

图 5　在不同培养基上增殖的 EC 中 PAs 含量

Fig. 5　The contents of PAs in EC from different treatment

2.3.2　不同 PAs 培养基上 EC PAs 代谢相关酶活性

P3、S7 处理上的 ODC 活性与对照（M3）无显著性差异，但 P3、S7、M3 处理上的 ODC 活性与 S2 处理的差异显著（图 6 ：A）。恢复培养后，P3M3 处理上的 ODC 活性显著低于 M3M3 处理，S2M3 和 S7M3 处理上的 ODC 活性仅略低于 M3M3 处理；P3M3 和 S7M3 处理上的 ODC 活性分别较 P3 和 S7 处理降低，S2M3 处理上的 ODC 活性反而高于 S2 处理。

P3 处理上的 ADC 和 DAO 活性显著高于 M3 处理，S7 处理上的 ADC 活性显著低于 M3 处理，S2 处理上的 ADC 活性、S2 和 S7 处理上的 DAO 活性仅略低于 M3 处理。恢复培养后，含 PAs 培养基上的 ADC 和 DAO 活性都降低且显著低于 M3M3 处理；P3M3 和 S2M3 处理上的 ADC 活性显著高于 S7M3，而 P3M3 和 S7M3 处理上的 DAO 活性显著高于 S2M3（图 6 ：B，C）。

S2 处理上的 PAO 活性显著高于 M3、P3 和 S7 处理，M3 处理上的 PAO 活性仅略高于 P3 和 S7 处理。恢复培养后，S2M3、S7M3 处理上的 PAO 活性变化相反，S2M3 处理上的 PAO 活性显著降低，S7M3 处理上的 PAO 活性显著升高，P3M3 处理上的 PAO 活性仅略降低；P3M3 处理上的 PAO 活性与 M3M3、S2M3 及 S7M3 处理上的 PAO 活性差异显著，但 S2M3 和 S7M3 处理上的 PAO 活性仅略高于 M3M3 处理（图 6：D）。

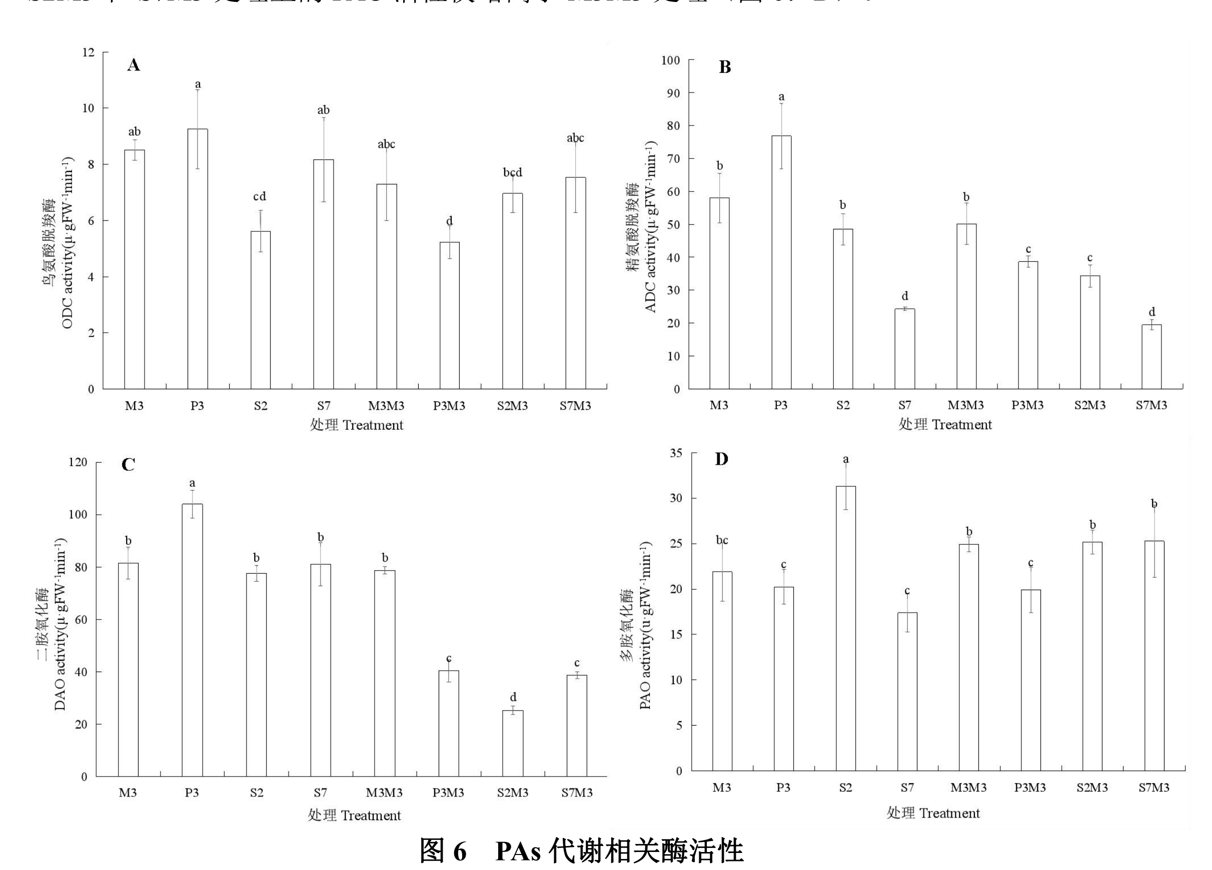


图 6　PAs 代谢相关酶活性

Fig. 6　Enzyme activities related to polyamines metabolism

3　讨论

大量研究证实，PAs 在 EC 诱导增殖、体胚发生和萌发等离体再生过程中起着重要作用（Rakesh et al., 2021）。本研究发现外源 PAs 均明显促进荔枝 EC 增殖，这一结果与 Paul 等（2009）和 Satish 等（2015）分别在苦瓜（*Momordica charantia*）、小米（*Eleusine coracana*）上的研究一致。Paul 等（2009）研究表明外源 Put 将苦瓜 EC 鲜重及体胚发生数量分别提高 5 和 2.5 倍，Satish 等（2015）研究指出外源 Spd 明显促进小米 EC 增殖及体胚发生，提高再生频率，说明不同 PAs 在 EC 增殖及体胚发生中起积极作用。但在本研究中，外源 PAs 反而抑制荔枝体胚发生，EC 增殖率越高时其体胚发生数量就较低，可能是由于 EC 增殖较快，

消耗大量营养，造成营养竞争，导致 EC 不能分化原胚或者原胚分化能力减弱。这与甜瓜（muskmelon）（薛淑媛，2013）、菊花（chrysanthemum）（郭俊娥，2014）等报道相似。本研究还发现 Put 促进荔枝体胚同步发生，这一现象与张佳琪等（2022）的研究一致，张佳琪等指出适宜浓度 PAs 均能显著提高黑果枸杞（*Lycium Ruthenicum*）体胚诱导率及同步化发生指数，而较高浓度 PAs 则会抑制黑果枸杞的体胚诱导率，可能与 PAs 在一定程度上促进 EC 增殖，消耗营养引起饥饿效应，导致 EC 都保持在一个相对一致的胚性状态有关。同时，本研究还发现 PAs 可改善 EC 状态，这与戴亚楠等（2015）在棉花（cotton）上的研究现象相似，戴亚楠等发现 PAs 处理后的棉花 EC 表现出利于分化体胚的棕色稀泥状态，而多胺抑制剂处理上的 EC 严重褐变；胡文等（2010）研究也指出 PAs 降低籼稻（Indica rice）EC 褐化率，说明 PAs 在维持 EC 细胞形态结构上起重要作用。

Berberich 等（2015）研究指出 PAs 的含量与外界环境关系密切，当植物受到非生物逆境胁迫时，内源 PAs 浓度迅速发生变化，刺激相关代谢酶活性，提高植物体内 PAs 的含量，增强胁迫条件下膜的稳定性。在本研究中，外源 PAs 增加了 3 种内源 PAs 含量，提高了 EC 的增殖率，与高娃（2008）和 Fu 等（2019）研究一致，高娃（2008）报道了外源 Put 提高沙地云杉（*Picea mongolica*）EC 中各类 PAs 含量，Fu 等（2019）也指出 Spd 能提高水稻（rice）内源 Spd 和 Spm 的含量。这可能是由于内源性 PAs 对非生物应激的保护反应，或者内源性 PAs 参与其他代谢途径，如氮代谢，以及与激素或信号分子的相互作用（Baron & Stasolla，2008），为 EC 的生长发育提供营养。本研究还发现经 PAs 处理过的 EC 恢复培养后，Put 含量仍显著高于对照，而 Spd 和 Spm 含量均显著低于对照，这可能与植物生长需要大量 Put，因此急需合成 Put 有关（Kiełkowska &Adamus, 2021）；或者由于 PAs 刺激后，EC 受残存外源 PAs 影响，内源 Put 分解途径减弱，导致 Put 积累含量升高，下游 Spd 和 Spm 含量降低，其作用机理有待进一步研究。

Rakesh 等（2021）研究表明底物的增加加快了内源 PAs 的转化率，在 ADC 或 ODC 的催化下，精氨酸和鸟氨酸分别通过 ADC 和 ODC 途径合成 Put，然后通过亚精胺合酶和精胺合酶合成 Spd 和 Spm。本研究发现外源 Put 刺激荔枝 EC 中的 ADC 和 ODC 活性总体上呈现上升趋势，ADC 反应迅速，并保持较高的增长速率，而 Put 对 ODC 活性增加的影响要小得多，说明 ADC 途径是合成 Put 的主要路径，这与 Mengoli 等（1989）和 Sun 等（2021）在胡萝卜（*Daucus carota*）、红掌（*Anthurium andraeanum* cv. Alabamb）中的研究结果一致，他们都指出 ADC 活性的增强是内源 PAs 合成的主要原因。然而，也有报道称内源 PAs 的积累主要是通过增加 ODC 活性来实现的（Saos & Hourmant，2001）。这些结果表明，Put 的合成途径与不同的外源物质或胁迫有不同的反应，也可能具有物种特异性。另外，在本研究中，Spd 和 Spm 处理降低了 ADC 和 ODC 活性，推测是由于 EC 利用外源 Spd 及 Spm，引起内源 Spd 及 Spm 含量过高，反馈抑制了 Put 分解，导致 ADC 和 ODC 活性降低；恢复培养解除 PAs 效应后，ADC 和 ODC 活性随着 Put 含量下降而减弱，这可能与 PAs 或作物种类有关，这些结果可以帮助我们更好地了解不同种类 PAs 在荔枝 EC 增殖及体胚分化中的特异性作用。

较多研究表明，外源 PAs 含量的增加加速了内源 PAs 的代谢，DAO 或 PAO 活性升高，促使 Spd 或 Spm 降解活动活跃，为作物生长发育提供营养物质，更好地平衡了转化和代谢（Agudelo-Romero et al., 2013；程文翰，2016）。本研究发现 P3 处理上的 DAO 及 S2 处理上的 PAO 活性显著高于对照，而其他处理上的 DAO 和 PAO 活性与对照无显著差异，陈小飞（2005）的研究则指出 Put 提高了石刁柏（*Asparagus officinalis* cv. UC800）EC 中的 PAO 活性，这可能与不同作物 EC 生长时所需的 PAs 种类及含量不同有关，导致 PAs 分解酶活性存在差异。另外，本研究中 Spm 处理上的分解酶 DAO 和 PAO 活性变化不大，而恢复培养后 Spm 培养基上的 PAO 活性反而升高，推测与 Spm 是 Put 及 Spd 的下游产物，其积累及分解代谢相对滞后，或者与 EC 生长所需含量相对较低有关（Tiburcio & Alcázar, 2017），其作用机理有待进一步验证。

4　结论

外源PAs可通过影响PAs代谢相关酶活性来改变内源PAs含量，进而提高荔枝EC增殖效率，促进体胚同步发生，但降低了体胚诱导效率。这些结果为进一步研究多胺调节荔枝EC增殖和体胚分化机制提供了基础。

参考文献：

AGUDELO ROMERO P, BORTOLLOTI C, PAIS MS, et al., 2013. Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism [J]. Plant Physiol Biochem, 67: 105-119.

BARON K, STASOLLA C, 2008. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development [J]. In Vitro Cell Develop Biol, 44: 384-395.

BERBERICH T, SAGOR GH, TOMONOBU K, 2015. Polyamines in plant stress response[M]// Polyamines: a universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism. Tokyo: Springer: 155-168.

CHEN HB, SU ZX, YANG SN, 2023. Investigation and analysis of the litchi production in China in 2023 [J]. China Trop Agric, 3: 13-22. [陈厚彬，苏钻贤，杨胜男，2023. 2023 年全国荔枝生产调查与形势分析[J]. 中国热带农业，3：13-22.]

CHEN XF, 2005. Study on polyamines roles in somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L [D]. Changsha: Hunan Agricultural University. [陈小飞，2005. 多胺在石刁柏体细胞胚胎发生中的作用研究[D]. 长沙：湖南农业大学.]

CHENG WH, 2016. Research on physiological and molecular mechanisms of somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[D]. Shihezi: Shihezi University. [程文翰，2016. 棉花体细胞胚胎发生的生理及分子机制研究[D]. 石河子：石河子大学.]

DAI YN, CHEN XY, YANG M, et al., 2015. A Prelimiary study on promoting cotton embryogenic callus differentiation using putrescine [J]. J Shihezi Univ(Nat Sci), 33(6): 667-671. [戴亚楠，陈晓宇，杨梅，等，2015. 腐胺促进棉花胚性愈伤组织分化的初步研究[J]. 石河子大学学报（自然科学版），33(6)：667-671.]

DAS DK, RAHMAN A, 2010. Expression of a bacterial chitinase (ChinB) gene enhances antifungal potential in transgenic *Litchi Chinensis* Sonn. (cv. Bedana) [J]. Curr Trends Biotechnol Pharm, 4(3): 820-833.

DAS DK, RAHMAN A, KUMARI D, et al., 2016. Synthetic seed preparation, germination and plantlet regeneration of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. Am J Plant Sci, 7: 1395-1406.

EL-DAWAYATI MM, GHAZZAWY HS, MUNIR M, 2018. Somatic embryogenesis enhancement of date palm cultivar Sewi using different types of polyamines and glutamine amino acid concentration under *in-vitro* solid and liquid medium conditions[J]. Int J Biosci, 12: 149-159.

FU YY, GU QQ, DONG Q, et al., 2019. Spermidine enhances heat tolerance of rice seeds by modulating endogenous starch and polyamine metabolism [J]. Molecules, 24, 1395.

GAO W, 2008. Study on polyamines roles in somatic embryogenesis in *Picea mongolica* (W.D.Xu) [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University. [高娃，2008. 沙地云杉体细胞胚胎发生过程中多胺作用机理的研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学.]

GUO JE, 2014. Studies on the mechanism of metabolism of PAs in Chrysanthemum during flower bud differentiation[D]. Tai’an: Shandong Agricultural University. [郭俊娥，2014. 菊花花芽分

化过程中多胺的代谢机制研究[D]. 泰安：山东农业大学.]

HU W, WANG WX, ZHOU J, et al., 2010. Determination of endogenous polyamines contents in callus from matured embryo of indica rice during subculturing [J]. Hubei Agric Sci, 49(7): 1697-1700. [胡文，王维旭，周杰，等，2010. 籼稻成熟胚愈伤组织继代培养过程中内源多胺含量的测定[J]. 湖北农业科学，49(7)：1697-1700.]

JI XZ, 2019. A preliminary study on the differential mechanism of somatic embryogenesis efficiency of two litchi varieties[D]. Haikou: Hainan University. [吉训志，2019. 2 个荔枝品种体胚发生差异机制的初步研究[D]. 海口：海南大学.]

KIEłKOWSKA A, ADAMUS A, 2021. Exogenously applied polyamines reduce reactive oxygen species, enhancing cell division and the shoot regeneration from *Brassica oleracea* L. var. capitata protoplasts [J]. Agron, 11: 735-754.

LI HL, 2009. RAPD analysis of genetic diversity and *in-vitro* conservation of ancient Litchi trees in Fuzhou City [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [李焕苓，2009. 福州市荔枝古树遗传多样性的 RAPD 分析及离体保存研究[D]. 福州: 福建农林大学.]

MA XY, YI GJ, HUANG XL, et al., 2008. Leaf callus induction and suspension culture establishment in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cv. Huaizhi [J]. Acta Physiol Plant, 31(2): 401-405.

MENGOLI M, BAGNI N, LUCCARINI G, et al., 1989. *Daucus carota* cell cultures: polyamines and effect of polyamine biosynthesis inhibitors in the preembryogenic phase and different embryo stages [J]. J Plant Physiol, 134: 389-394.

PAUL A, MITTER K, RAYCHAUDHURI SS, 2009. Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 97(3): 303-311.

PUCHOOA D, 2004. *In vitro* regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. Afr J Biotechnol, 3(11): 576-584.

QIN YQ, 2019. Establishment of somatic embryogenesis regeneration system and preliminary study on genetic transformation in *Litchi chinesis* ‘Heiye’ [D]. Guangzhou: South China Agricultural University. [秦雅琪，2019. ‘黑叶’荔枝体细胞胚胎再生体系的建立及转基因初步研究[D]. 广州：华南农业大学.]

RAHARJO SHT, LITZ RE, 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) from leaves of mature phase trees [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 89: 113-119.

RAKESH B, SUDHEER WN, NAGELLA P, 2021. Role of polyamines in plant tissue culture: an overview [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 145(3): 487-506.

SAOS FL, HOURMANT A, 2001. Stimulation of putrescine biosynthesis via the ornithine decarboxylase pathway by gibberellic acid in the *in vitro* rooting of globe artichoke (*Cynara scolymus*) [J]. Plant Growth Regul, 35, 277-284.

SATHISH D, THEBORAL J, VASUDEVAN V, et al., 2019. Exogenous polyamines enhance

somatic embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediumted transformation efficiency in sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid)[J]. In Vitro Cell Develop Biol, 56(1): 29-40.

SATISH L, RENCY AS, RATHINAPRIYA P, et al., 2015. Influence of plant growth regulators and spermidine on somatic embryogenesis and plant regeneration in four Indian genotypes of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn) [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 124(1): 15-31.

SUN XL, YUAN ZB, WANG B, et al., 2021. Exogenous putrescine activates the arginine-polyamine pathway and inhibits the decomposition of endogenous polyamine in *Anthurium andraeanum* under chilling stress [J]. Sci Hort, 282, 110047.

TANG QY, 2010. Data processing system-experimental design, statistical analysis and data mining[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press. [唐启义，2010. DPS 数据处理系统，实验设计、统计分析及数据挖掘[M]. 2 版. 北京：科学出版社.]

TIBURCIO AF, ALCÁZAR R, 2017. Potential applications of polyamines in agriculture and plant biotechnology [M]//Polyamines: methods and protocols, methods in molecular biology. Berlin: Springer, 1694: 489-508.

WANG G, LI HL, WANG SJ, et al., 2016. *In vitro* regeneration of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. Afr J of Biotechnol, 15: 1026-1034.

WANG G, LIU Y, GAO ZY, et al., 2023. Effects of amino acids on callus proliferation and somatic embryogenesis in *Litchi chinensis* cv. ‘Feizixiao’ [J]. Horticulturae, 9: 1311.

WANG G, LIU YT, GAO ZY, et al., 2021a. Changes in structure and polyamine metabolism of litchi callus during subculture and somatic embryo development [J]. J Fruit Sci, 38(11): 1911-1920. [王果，刘耀婷，高兆银，等，2021a. 荔枝愈伤组织继代及体胚发生过程中结构与多胺含量的变化 [J]. 果树学报，38(11)：1911-1920.]

WANG G, LIU YT, LI HL, et al., 2021b. Effects of exogenous polyamine application on proliferation of calluses and somatic embryogenesis in *Litchi chinensis* Sonn. cv. Feizixiao [J]. J Fruit Sci, 38(12): 2135-2147. [王果，刘耀婷，李焕苓，等，2021b. 外源多胺对荔枝愈伤组织增殖及体胚发生的作用[J]. 果树学报，38(12)：2135-2147.]

WANG G, LIU YT, LI HL, et al., 2023. Study on the optimization of amino acids on proliferation of callus and somatic embryogenesis in *Litchi chinensis* Sonn. cv. Feizixiao [J]. J Fruit Sci, 40(11): 2466-2476. [王果，刘耀婷，王家保，等，2023. 氨基酸对荔枝愈伤组织增殖及体胚发生体系优化的研究[J]. 果树学报，40 (11)：2466-2476.]

XUE SY, 2015. Effects of exogenous PAs on photosynthetic physiology and ultra structure of *Muskmelon* seedlings under salt stress [D]. Anhui: Anhui Agricultural University. [薛淑媛，2013. 外源多胺对盐胁迫下甜瓜幼苗光合生理和超微结构的影响[D]. 安徽：安徽农业大学.]

YU CH, CHEN ZG, LU LX, et al., 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from litchi protoplasts isolated from embryogenic suspension [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 61: 51-58.

ZHANG JQ, WANG HN, CHEN W, et al., 2022. Effect of polyamines on high frequency induction and synchronization of somatic embryo of *Lycium elanocarpus* [J]. J Chin Med Mat, 45(1): 27-31. [张佳琪，王浩宁，陈薇，等，2022. 多胺对黑果枸杞体细胞胚高频诱导及同步化发生的影响[J]. 中药材，45(1)：27-31.]

ZHAO FG, LIU YL, 2000. Study on determination of ADC and TGase activities [J]. Technol Meth, 36(5): 442-445. [赵福庚，刘友良，2000. 精氨酸脱羧酶和谷酰胺转移酶活性的测定方法[J]. 技术与方法，36(5)：442-445.]